

MODIFIED MATRIX METALLOPROTEASE-3

Patent number: JP11169176
Publication date: 1999-06-29
Inventor: MATSUMOTO SHUNICHIRO; KATO MASAO; KURIHARA HIROYUKI; SAKAHA NANA; SAITO SHIGEKI; TAKAYAMA MARI
Applicant: YAMANOUCHI PHARMACEUT CO LTD
Classification:
- international: C12N15/09; A61K38/43; A61K38/43; A61K38/43; C12N1/21; C12N9/64
- european:
Application number: JP19970345008 19971215
Priority number(s):

Report a data error here

Abstract of JP11169176

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject metalloprotease-3 having an angiotensin I-converting activity without causing anaphylaxis, having excellent stability, and useful for medicine for treating herniated intervertebral disk, antitumor medicines, etc. by disposing a specific amino acid sequence.

SOLUTION: This metalloprotease-3 has an amino acid sequence of formula I having an active domain at least ranged from the 100-amino acid to the 274-amino acid from the N-terminal and modified with Ile or Tyr as the 172-amino acid residue Xaa, with Val or Leu as the 239-amino acid residue Xaa and with continuous His-Ser-Leu or Asn-Ala-Phe as the 241 to 243 amino acid residue Xaa-Xaa-Xaa or an active domain obtained by substituting, deleting or inserting the amino acids of the amino acid sequence. The active domain includes an amino acid sequence of formula II. The modified human matrix metalloprotease-3 is obtained by culturing a host cell transformed with a vector containing a DNA encoding the protease-3.

Met Lys Ser Leu Pro Ile Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala Val Cys Ser
1 6 10 15
Ala Tyr Pro Leu Asp Gly Ala Ala Arg Gly Glu Asp Thr Ser Met Asn
20 25 30
Phe Phe Thr Gly Ser Ser Glu Leu Glu Phe Asp Pro Asn Ala Lys Lys
450 455 460
Val Thr His Thr Leu Lys Ser Asn Ser Trp Leu Asn Cys
465 470 475

1

ADGGCTGGCC TTC AGA ACC TTT DCT GGC ATC CCG AAG TGG AAG AAA ACC CAC
Phe Arg Thr Phe Pro Gly Ile Pro Lys Trp Arg Lys Thr His
1 5 10
CCT ACA TAC AGC ATT CTG AAT TAT ACA CCA GAT TTT CCA AAA GAT GCT
Leu Thr Tyr Asn Ile Val Asn Tyr Thr Pro Asn Leu Pro Lys Asp Ala
15 20 25 30
GGC ATT CAG TCC CTC CAT GGA GCT DCG CCG GAG TCC GCT GAG ACC GCG
Gly Ile Glu Ser Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Asp Ser Pro Glu Thr Pro
160 165 170

CTG TGA
Leu
175

51
52
53

II

Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-169176

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月29日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/43	A B J	1/21	
	A D U	9/64	
	A E D	A 6 1 K 37/48	A B J
C 1 2 N 1/21			A D U
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 17 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平9-345008

(22) 出願日 平成9年(1997)12月15日

(71) 出願人 000006677

山之内製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

(72) 発明者 松本 俊一郎

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 加藤 正夫

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 栗原 宏之

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(74) 代理人 弁理士 長井 省三 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変型マトリックスメタロプロテアーゼ-3

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、安定化された改変型マトリックスメタロプロテアーゼ-3の提供。

【解決手段】 配列番号2記載のアミノ酸配列中N末側から172番目のアミノ酸残基Xaaは-Ile-又は-Tyr-で、239番目のアミノ酸残基Xaaは-Val-又は-Leu-で、241乃至243番目のアミノ酸残基-Xaa-Xaa-Xaa-は、連続する-His-Ser-Leu-又は-Asn-Ala-Phe-で改変された、少なくともN末側から第100番乃至第274番目まで活性ドメイン又は該アミノ酸配列のアミノ酸を置換、欠失又は挿入した活性ドメインを有し且つ安定性を有する改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3。但し同時に172番目のアミノ酸残基Xaaは-Tyr-、239番目のアミノ酸残基Xaaは-Leu-及び241乃至243番目の連続したアミノ酸残基-Xaa-Xaa-Xaa-は-His-Ser-Leu-を選択しない。

【効果】 椎間板ヘルニア治療薬又は抗腫瘍剤として有用。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2記載のアミノ酸配列であつて、N末側から172番目のアミノ酸残基Xaaは-Ile-又は-Tyr-で、239番目のアミノ酸残基Xaaは-Val-又は-Leu-で、241乃至243番目のアミノ酸残基-Xaa-Xaa-Xaa-は、連続する-His-Ser-Leu-又は-Asn-Ala-Phe-で改変された、少なくともN末側から第100番乃至第274番目まで活性ドメイン又は該アミノ酸配列のアミノ酸を置換、欠失又は挿入した活性ドメインを有し且つ安定性を有する改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3。但し同時に172番目のアミノ酸残基Xaaは-Tyr-、239番目のアミノ酸残基Xaaは-Leu-及び241乃至243番目の連続したアミノ酸残基-Xaa-Xaa-Xaa-は-His-Ser-Leu-を選択しない。

【請求項2】 活性ドメインが配列番号3、4、5又は6の何れか記載のアミノ酸配列である請求項1記載の改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3。

【請求項3】 配列番号7記載のアミノ酸配列であつて、N末側から73番目のアミノ酸残基Xaaは-Ile-又は-Tyr-で、140番目のアミノ酸残基は-Val-又は-Leu-で、142乃至144番目のアミノ酸残基-Xaa-Xaa-Xaa-は、連続する-His-Ser-Leu-又は-Asn-Ala-Phe-で改変された、安定性を有する改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3断片。但し同時に73番目のアミノ酸残基Xaaは-Tyr-、140番目のアミノ酸残基Xaaは-Leu-及び142乃至144番目の連続したアミノ酸残基-Xaa-Xaa-Xaa-は-His-Ser-Leu-を選択しない。

【請求項4】 配列番号3、4、5又は6の何れか記載のアミノ酸配列を有する請求項3記載の改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3断片。

【請求項5】 請求項1又は3記載の改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3をコードするDNA。

【請求項6】 請求項5記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。

【請求項7】 請求項6記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項8】 請求項7記載の宿主細胞を培養することを特徴とする請求項1記載の改変型マトリックスメタロプロテアーゼ-3の製造方法。

【請求項9】 請求項1乃至4の何れかに記載の改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3又はその断片を含有する医薬。

【請求項10】 椎間板ヘルニア治療剤又は抗腫瘍剤である請求項9記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する分野】 本発明は、改変型マトリックスメタロプロテアーゼ-3（以下MMP-3）、及びその医薬、殊に椎間板ヘルニアの治療剤又は抗腫瘍剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 マトリックスメタロプロテアーゼ（MMPs）は金属依存性のプロテアーゼの総称であり、これまでにヒトで14種類の分子がこのファミリーに属すると報告されている。MMPファミリーのプロテアーゼ活性により、細胞外マトリックス（以下ECMという）構成タンパクは分解される。理論上、全てのECMはMMPsにより分解され得る。しかしながらMMPsによるECM分解は、(I) MMPsの遺伝子発現制御、(II) 前駆型MMPから活性型MMPへの活性化、(III) tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) による酵素活性阻害の3段階で調節されており、こうした厳密な活性制御により、生体内組織の恒常性が維持されている。MMPsの基本構造はN末側から、アミノ酸約20個よりなる「シグナルペプチド領域」、約80個よりなる「プロドメイン（プロペプチドドメイン）」、約160個よりなる「活性ドメイン（触媒領域）」更にその下流には約210個よりなる「ヘモベキシン様ドメイン」が存在している。MMP-3は、ストロメライシン-1とも呼ばれ、酵素の基質特異性を基にして、「ストロメライシン属」サブファミリーに分類されている。ヒトMMP-3は1988年に遺伝子が同定され（Saus J., Quinones S., Otani Y., Nagase H., Harris E. D., Jr., Kurkinen M.: J. Biol. Chem. 1988 263:6742-6745.）、アミノ酸477個より構成され、前駆体が57kDa、活性型が45kDaの分子量を持つ事が判明した。MMP-3はIL-1やTNFにより遺伝子レベルでの発現誘導が起こるが、正常状態ではほとんど発現が認められず、炎症時に局所的に発現が観察される。従って通常ヒトMMP-3は、発現しても短時間で分解する。MMP-3はプロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニンなど多様なECM成分を分解基質とする一方で、MMP-1やMMP-9を始め、他のMMPsの活性化に関与すると考えられている（Suzuki K., Enghild J. J., Morodomi T., Salvesen G., Nagase H.: Biochemistry 1990, 29:10261-10270., Ogata Y., Enghild J. J., Nagase H.: J. Biol. Chem. 1992, 267:3581-3584.）。またMMP-3の作用としては組織の分化、形成、又は修復が挙げられる。主な例には、骨成長時に於ける成長軟骨層での発現（Brown C. C.,

Hembry R. M., Reynolds J. J.: *J. Bone Joint Surg. Am.* 1989, 71:580-593.), 離乳後の乳腺退縮時に於ける発現 (Talhouk R. S., Bissell M. J., Werb Z.: *J. Cell Biol.* 1992, 118:1271-1282.), 更に発毛周期の毛嚢形成時に於ける発現制御 (Goodman L. V., Ledbetter S. R.: *J. Cell Physiology* 1992, 151:41-49.) などがあり, MMP-3の活性発現が多方面にわたっていると考えられる。椎間板ヘルニア部位では、椎間板中心の髄核が変性、脆弱化した線維輪の裂け目から脱出し腰髄神経根を圧迫する。症状としては、筋性防御から起こる腰痛は必発で、座骨神経の走行に沿った殿部から下腿に放散する神経痛が特徴的である。髄核が正中で大きく突出する場合は、排尿困難、インポテンツが出現することもある。大部分は保存的療法を行うが、重症例では外科的手術による脱出髄核の除去が必要となる。手術療法の代替するものとして近年ケモヌクレオリシス (chemonucleolysis) 療法が開発され、欧米では一般的な療法の一つになっている。本療法は1963年Smithにより初めて報告され (Smith L., Ill E.: *Nature* 1963, 198:1311-1312), パパイヤより抽出した蛋白分解酵素であるキモババインを椎間板内に注入するというものである。chemonucleolysisの作用機序は次のように考えられている。椎間板内に注入されたキモババインが椎間板軟骨基質内のプロテオグリカンのコア蛋白、リンク蛋白を分解し、その結果、軟骨基質の保水能が低下し、椎間板内圧が低下するというものである。米国では、1982年に認可され、カナダ、欧州、及び豪州では臨床応用されている。chemonucleolysisで利用するプロテアーゼ、キモババインは、システインプロテアーゼの一種で、A、B2種類のアイソザイムが存在し、それぞれ分子量は36.4 kDaと34.5 kDaである。キモババインは、パパイヤより抽出される異種蛋白であることから、該蛋白をヒトに投与にするとアナフィラキシーを生じてしまう恐れがある。従って、アナフィラキシーを生じない薬剤が望まれている。

【0003】血管新生は、通常増殖することのない血管内皮細胞の増殖が必須の要因となる。体内組織に行き渡り、栄養を与え、老廃物を除去する働きをもつ血管は、正常状態に於いては伸長する事はない。しかしながら、創傷治癒や月経周期に於いては主に細静脈より新生血管が発生する。この過程を血管新生と呼ぶが、病理状態に於ける血管新生は、ガンに於いてしばしば観察される。ガン細胞が正常状態から逸脱した増殖能力を獲得するためには新生血管による過剰な栄養の供給を行う必要があ

る。事実、ガン細胞が少数の細胞集団から発育して、遠隔臓器に転移する過程では血管新生が重要な役割を果たしている。そのため、血管新生の抑制はガン治療の有効な方法であると考えられている。アンジオスタチン (angiostatin) は、1994年に報告された血管新生抑制因子で (O'Reilly M. S. et al.: *Cell* 1994, 79:315-328), 血栓溶解因子プラスミンの前駆体である、プラスミノゲンのN末端側の約40 kDaのドメインである。アンジオスタチンは血管内皮細胞に対して特異的な増殖抑制活性を有している。該蛋白質をガン移植モデル動物に投与すると、ガン細胞増殖抑制が観察された (O'Reilly M. S. et al.: *Nature Medicine* 1996, 2:689-692)。従ってアンジオスタチン変換活性を有する物質は優れた抗腫瘍剤となりうる。当該活性を有する物質としては、MMPファミリーに属するMMP-12がある。しかしながら他のMMPs, 例えばMMP-2, MMP-9は、該活性を有さないことが報告されている (Dong Z. et al.: *Cell* 1997, 88:801-810)。MMP-3については、当該活性を有することは未だ報告されていない。

【0004】

【発明が解決する課題】本発明は、ケモヌクレオリシス法においてアナフィラキシーを生じない優れた椎間板ヘルニア治療剤及びアンジオスタチン変換活性を有する優れた抗腫瘍剤の提供を目的とする。

【0005】

【課題が解決する手段】かかる状況下、本発明者らは上記課題の克服を目的として、不安定でこれまでその生理活性すら確認されていなかったヒトMMP-3の生理活性につき鋭意検討した結果、MMP-3の安定性には種差が存在することを確認し、その種差を利用してヒトMMP-3を改変することにより、天然のヒトMMP-3に比し優れた持続性を有するMMP-3断片を創製することに成功し、かつ驚くべきことに該改変型MMP-3断片が椎間板ヘルニアの優れた治療作用及びアンジオスタチン変換活性に基づく優れた抗腫瘍作用を有することを見だし、更に研究を重ねて本発明を完成した。

【0006】以下、本発明につき詳述する。天然のヒトMMP-3は、分解されやすい持続性の少ない不安定な酵素である。本発明者らは、持続性のある安定なヒトMMPやヒト以外のMMP-3につき鋭意検討した結果、ウサギMMP-3が優れた持続性・安定性を有することを見出した。アミノ酸レベルでは、ヒトとウサギでMMP-3は80%以上保存されている。そこで、約200アミノ酸より構成されるウサギMMP-3活性ドメインを立体構造解析し、ヒトMMP-3と比較したところ、触媒ポケット近傍 (配列番号1の172番目のアミノ酸残基Tyrから244番目のアミノ酸残基Thr)

の8Å以内では、3カ所、合計5アミノ酸しか変わらない事が判明した。本発明者らはこれらのアミノ酸の相違が安定性の違いの原因と考え、それらの部位のヒトMMP-3アミノ酸をウサギMMP-3アミノ酸に変換し、酵素活性及び安定性を調べた。その結果、例えば3カ所の部分の内、C末側の2カ所、合計4アミノ酸をウサギ型に変換した改変型MMP-3が鑄型としたヒトMMP-3よりもより酵素活性が同等以上で且つ高い安定性を有することを見いだした。本発明は、具体的には

① 配列番号2記載のアミノ酸配列であって、N末側から172番目のアミノ酸残基Xaaは-Ile-又は-Tyr-で、239番目のアミノ酸残基Xaaは-Val-又は-Leu-で、241乃至243番目のアミノ酸残基-Xaa-Xaa-Xaa-は、連続する-His-Ser-Leu-又は-Asn-Ala-Phe-で改変された、少なくともN末側から第100番乃至第274番目までの活性ドメイン又は該アミノ酸配列のアミノ酸を置換、欠失又は挿入した活性ドメインを有し且つ安定性を有する改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3（但し同時に172番目のアミノ酸残基Xaaは-Tyr-、239番目のアミノ酸残基Xaaは-Leu-及び241乃至243番目の連続したアミノ酸残基-Xaa-Xaa-Xaa-は-His-Ser-Leu-を選択しない。）、具体的には②活性ドメインが配列番号3、4、5又は6の何れか記載のアミノ酸配列である上記①記載の改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3、また③配列番号7記載のアミノ酸配列であって、N末側から73番目のアミノ酸残基Xaaは-Ile-又は-Tyr-で、140番目のアミノ酸残基は-Val-又は-Leu-で、142乃至144番目のアミノ酸残基-Xaa-Xaa-Xaa-は、連続する-His-Ser-Leu-又は-Asn-Ala-Phe-で改変された、安定性を有する改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3断片（但し同時に73番目のアミノ酸残基Xaaは-Tyr-、140番目のアミノ酸残基Xaaは-Leu-及び142乃至144番目の連続したアミノ酸残基-Xaa-Xaa-Xaa-は-His-Ser-Leu-を選択しない。）、好ましくは④配列番号3、4、5又は6の何れか記載のアミノ酸配列を有する③記載の改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3断片であり、更に⑤①又は③記載の改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3をコードするDNA、⑥⑤記載のDNAを含むことを特徴とするベクター、⑦⑥記載のベクターで形質転換された宿主細胞、又は⑧⑦記載の宿主細胞を培養すること、特徴とする①又は③記載の改変型マトリックスメタロプロテアーゼ-3の製造方法であり、⑨①乃至④の何れかに記載の改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3又はその断片を含有する医薬、好ましくは椎間板ヘルニア治療剤又は抗腫瘍剤である。

[0007]

【発明の実施の形態】以下、本発明で使用する用語に付き説明する。「安定性」とは、本発明改変型MMP-3が自身或いは他のプロテアーゼにより分解されにくく、長時間活性を保持したまま存在可能な状態を意味する。「活性ドメイン」とは、前述の通りMMPの基本構造の一部を意味し、該基本構造のN末側からアミノ酸約20個シグナルペプチド領域、約80個よりなるプロドメイン領域に続く約160個よりなる領域部分を意味する。「アミノ酸の置換、欠失又は挿入」とは、本発明でアミノ酸を改変させた部位、すなわち配列番号2に記載されたアミノ酸配列のN末側から172番目、239番目及び241乃至243番目のアミノ酸の部位以外の部位に1又は複数個のアミノ酸を置換、欠失又は挿入することを意味する。従って、本発明改変型ヒトMMP-3又はその断片は、優れた安定性を有するものなら何れでもよく、具体的には配列番号2記載のアミノ酸配列中少なくともN末側から第100番乃至第274番目まで活性ドメイン又は該アミノ酸配列のアミノ酸を置換、欠失又は挿入した活性ドメインを有する改変型ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ-3（該配列番号2記載のアミノ酸配列であって、N末側から172番目のアミノ酸残基Xaaは-Ile-又は-Tyr-を、239番目のアミノ酸残基は-Val-又は-Leu-を、241乃至243番目のアミノ酸残基-Xaa-Xaa-Xaa-は、連続する-His-Ser-Leu-又は-Asn-Ala-Phe-を意味する。但し同時に172番目のアミノ酸残基Xaaは-Tyr-、239番目のアミノ酸残基Xaaは-Leu-及び241乃至243番目の連続したアミノ酸残基-Xaa-Xaa-Xaa-は-His-Ser-Leu-を選択しない。）であり、また1又は複数個のアミノ酸で置換、欠失又は挿入された改変型MMP-3も同等の効果を有するものであれば本発明に包含される。本発明の改変型MMP-3又はその断片は、例えば、遺伝子組換え技術によって、以下に述べる方法に従って製造される。配列表の配列番号2又は7で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する本発明のDNAは、例えば、遺伝子組換え法又は化学合成法、或いはこれらを適宜併用することによって合成させる。化学合成法を用いる場合、例えば、ホスホアミダイト法[Hunkapiller, M. et al., Nature, 310, 105-111 (1984)]等の常法に従って、核酸の化学合成を行うことができる。遺伝子組換え法を用いる場合は、例えば、Saus, J. et al., J. Biol. Chem. 263, 6742-6745 (1988)に記載されている通り、ヒトMMP-3産生細胞から得られるmRNAより作製されたcDNAライブラリーより、天然型ヒトMMP-3をコードするcDNAを含むクローンを単離し、この単離されたクローンより、天然型ヒトMMP

-3をコードするcDNAを分離する。このcDNAを
 テンプレートとして用い、所望のアミノ酸置換を導入す
 ることができるように設計したプライマーで、ポリメ
 ラーゼ・チェイン・リアクション（以下、PCRと称す
 る）を行うことによって、天然型ヒトMMP-3をコー
 ドするcDNAの塩基配列中、本発明により改変された
 アミノ酸に対応するコドン部分を有するDNA断片を得
 ることができる。この際に用いるテンプレートとして、
 前述のcDNAライブラリーそのもの、若しくは、MM
 P-3発現細胞から調整したRNAより逆転写酵素で合
 成したcDNAを使用することも可能である。また、前
 記のPCRで得られたDNA断片を天然型ヒトMMP-3
 をコードするcDNAの対応する部分と置き換えたもの
 をテンプレートとし、再び所望のMMP-3 cDN
 Aを増幅するようにデザインしたプライマーを用いてP
 CRを供することにより、本発明のDNAを得ることが
 できる。或いは、前記のPCRにより得られたDNA断
 片を予め作製しておいたMMP-3をコードするcDN
 A断片の対応する部分と置き換えることにより本発明の
 DNAを得ることができる。具体的なプライマーの設
 計、及び置き換えに利用可能な制限酵素部位の選択等
 については、後述の実施例で詳述する。こうして得られ
 た本発明のヒトMMP-3活性を有する改変ポリペプチド
 をコードするDNAのコード領域の全長部分を、真核及
 び原核生物を宿主として発現させることが可能である。
 これら宿主細胞に組み込まれる発現ベクターは、宿主細胞
 に応じて適宜構築される。原核生物の宿主として
 は、大腸菌の菌株、例えば大腸菌K12株294 (AT
 CC 31446)、大腸菌B、大腸菌X1776 (A
 TCC 31537)、大腸菌C600及び大腸菌W3
 110 (F⁻, λ⁻, プロトトロフィック, ATCC
 27375)、BL21 (ノバジェン社)、バチラス属
 の菌株、例えば枯草菌、ネズミチフス菌 (*Salmon
 ella typhimurium*) 或いは盤菌 (*Ser
 ratia marcescens*) 等の大腸菌以外
 の腸内細菌、シュードモナス属の菌株等が挙げられる。
 上記微生物を宿主として使用する場合のベクターとして
 は、本発明遺伝子が発現できるように該遺伝子上流に
 プロモーター及びSD塩基配列 [Shine, J. et
 al. Proceedings of the Na
 tional Academy of Sciences
 of the U. S. A., 71, 1342~134
 6 (1974)], 更に蛋白合成開始に必要なATGを
 付与した発現プラスミドが挙げられる。大腸菌株等のベ
 クターとしては一般にpUC18, pUC19, pET
 (ノバジェン社)等がよく用いられる。プロモーターと
 しては、例えばトリプトファン・プロモーター, P_Lプロ
 モーター, lacプロモーター, lppプロモータ
 ー, β-ラクタマーゼプロモーター, T7プロモーター
 等が挙げられる。マーカー遺伝子の例としては、アンピ

シリン耐性遺伝子, テトラサイクリン耐性遺伝子又は、
 クロラムフェニコール遺伝子等が挙げられる。また真核
 微生物としては酵母が一般によく用いられ、その中でも
 サッカロミセス属酵母を有利に利用できる。該酵母等の
 真核微生物の発現ベクターとしては、例えば、YRp7
 等が挙げられる。酵母発現用の発現ベクターのプロモ
 ーターの例としては、3-ホスホグリセレートキナーゼ又
 はエノラーゼ, グリセルアルデヒド-3-ホスフェート
 デヒドロゲナーゼ, ヘキソナーゼが挙げられる。マーカ
 ー遺伝子としては、trp1遺伝子等を利用することが
 できる。酵母細胞中における転写や翻訳を制御するた
 めの複製起源や終始コドン及びその他のDNA配列として
 は、酵母細胞に適している通常の公知のDNA配列が挙
 げられる。高等動物の培養細胞を宿主とする場合には、
 赤毛ザル腎臓細胞, 蚊の幼虫の細胞, アフリカミドリサ
 ル腎臓細胞, マウス胎児維持芽細胞, チャイニーズハム
 スター卵巣細胞, 及びそのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠
 損株 [Urlaub, G., et al., Proce
 edings of the National Aca
 demy of Sciences of the
 U. S. A., 77, 4216-4220 (198
 0)] ヒト頸上皮細胞, ヒト胎児腎臓細胞, 蛾卵巣細胞,
 ヒト骨髓腫細胞, 又はマウス繊維芽細胞等を用いる
 ことができる。そのベクターは、一般に本発明のDNA
 を宿主細胞内で発現させるための機能配列, 例えば複製
 開始点, 本発明DNAの上流に位置すべきプロモータ
 ー, リボソーム結合部位, ポリアデニル化部位, 転写終
 止配列を含有している。プロモーターは、例えばアデ
 ノウイルス2主後期プロモーター, SV40初期プロモ
 ーター, SV40後期プロモーター, 真核生物遺伝子か
 らのプロモーター (例えば, エストロゲン誘導ニワトリ
 卵アルブミン遺伝子, インターフェロン遺伝子, グルコ
 コルチコイド誘導チロシンアミノトランスフェラーゼ遺
 伝子, チミジンキナーゼ遺伝子, 主初期及び後期アデノ
 ウイルス遺伝子, ホスホグリセレートキナーゼ遺伝子,
 又はα因子遺伝子等) が好ましい。複製開始点として
 は、アデノウイルス, SV40, ウシバビローマウイル
 ス (BPV), 水泡性口内炎ウイルス (VSV), 又は
 それらの誘導体ベクター由来のものを用いることができ
 る。また、この際のマーカー遺伝子としては、例えばネ
 オマイシン耐性遺伝子, メトトレキセート耐性ジヒドロ
 葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子等を用いることができ
 る。高等動物細胞用の発現ベクターとしては、例え
 ば, pEF-BOS, pSRα等のベクターを用いると
 発現効率が良いため有効なベクターとして挙げられる。
 以上、本発明のDNAの発現に利用することができる宿
 主、ベクター及びその構成要素を例示したが、これらの
 例示に限定されるわけではない。上記で得られる本発明
 の組換えベクターを、常法に従い所望の宿主へ導入する
 ことにより、本発明の形質転換体を得ることができる。

前記発現ベクター・プラスミドは、遺伝子構築に用いた宿主（例えば大腸菌HB101株等）中より、アルカリ溶菌法等の一般的方法により調製される。調製したベクター・プラスミドを用いて宿主を形質転換する方法としては、哺乳動物細胞を宿主とする場合はリン酸カルシウム法 [van der Eb, A. J. et al., *Methods in Enzymology*, 65, 826-839 (1980), Academic Press.] 等を例示することができる。上記で得られる本発明の形質転換体を、常法に従い培養し、前記培養により生物活性を有する本発明の改変ポリペプチドが生産、蓄積される。前記培養に用いられる培地としては、採用した宿主に応じて慣用される各種のものが適宜選択され、例えば上記CHO細胞であればMEM- α 培地に必要に応じ牛胎児血清 (FCS) 等の血液成分を添加したものが挙げられる。前記形質転換体で生産される本発明の改変型MMP-3又はその断片の発現部位は、合成したDNAでコードされるアミノ酸配列、使用するベクターの種類、宿主の種類、及びそれらの組合せによって異なるため、細胞内、又は細胞培養上清に本発明MMP-3又はその断片は生産される。種々の形質転換体より生産される本発明の改変型MMP-3又はその断片は、その物理的性質、化学的性質を利用した各種の分離操作（例えば、日本生化学会編生化学データブックII, 1175頁, 第1版, 第1刷, 1980年, 株式会社東京化学同人, 等）により分離精製される。具体的な改変ポリペプチドの精製は、ポリペプチドの性質に応じ、例えば、分子ふるいクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、硫酸沈殿法、有機溶媒沈殿法、トリクロロ酢酸沈殿法、電気泳動法などの方法を必要に応じて適宜組み合わせで行われる。本発明の改変ポリペプチドを標識との融合タンパク質として発現させた場合には、該標識に対するアフィニティービーズ或いは特異的抗体などを用いて容易に精製を行うことが可能である。以上、本発明の改変ポリペプチド、このポリペプチドをコードするDNA、このDNAを含む発現ベクター、この発現ベクターを含む形質転換体、及び該改変ポリペプチドの製造方法について説明した。次に本発明の医薬につき、詳述する。本発明の医薬は、非経口投与、即ち、皮下、筋肉内椎間板内又は静脈内投与に有効である。非経口投与用組成物は、通常、投与可能な担体、好ましくは水性担体に溶解した、本発明改変型MMP-3又はその断片の溶液からなる。種々の水性担体、例えば水、緩衝水、0.4%の食塩水、0.3%のグリシン、5%のグルコース、ヒトアルブミン溶液等を使用することができる。これらの溶液は無菌であり、そして一般的に粒子形成性物質を有していない。これらの組成物は、慣用で周知の滅菌技術によって滅菌することができる。これら

組成物は、緩衝化剤、等張化剤等のような、生理的条件下に近づけるのに必要な薬剤学的に許容される補助物、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等を含有することができる。非経口的に投与できる組成物の実際の製造は、当該技術分野の熟練者に既知又は周知の技術を用いて行うことが可能であり、例えば「Remington's Pharmaceutical Science, 第15版, Mack Publishing Company, ペンシルベニア州イーストン (1980)」に記載されている。本発明のMMP-3又はその断片又はその医薬は、冷凍して貯蔵するか、凍結乾燥によって貯蔵し使用する前に適当な溶媒に溶解して再生して使用することができる。凍結乾燥及び再生は、当業者に既知の技術を用いることができる。

【0008】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を詳述するが、本発明はそれらに限定されるものではない。

【0009】実施例1

(遺伝子構築) 以下にHR123の大腸菌発現プラスミド構築の実際について示す。まず、HR1FW (ACATGGAGACTTTATTCCTTTTGATGGACCTGGAA: 配列番号8), HR1RV (TTCCAGGTCCATCAAAAGGAATAAACTCTCCATGT: 配列番号9), HR2FW (ATGTACCCAGTCTATCACTCACTCACACCTGAC: 配列番号10), HR2RV (GTCAGGTCTGTGAGTGAGTATAGACTGGGTACAT: 配列番号11), HR3FW (ATGTACCCACTCTATAACGCCTTCACAGACCTGAC: 配列番号12), HR3RV (GTCAGGTCTGTGAAGCGGTATAGAGTGGGTACAT: 配列番号13), HR23FW (ATGTACCCAGTCTATAACGCCTTCACAGACCTGAC: 配列番号14), HR23RV (GTCAGGTCTGTGAAGCGGTATAGACTGGGTACAT: 配列番号15), PROPCATfw (CATGCCATGGCTATCCATTGGATGGAGC: 配列番号16), CATfw (CATGCCATGGCTAGCTTCAGAACCTTTCTGGCAT: 配列番号17), H3-5R' (GCATCCACGCCTGAAGGAAG: 配列番号18), RV (CGCGATCCTCACAGGGGGTCTCAGGGGAGT: 配列番号19) の12本のprimerを合成した。PCR反応は二段階に分けて行い、それぞれ100 μ lの系に、1 μ lのpfu DNA polymerase (ストラタジーン社), 30ngのヒトMMP-3全長cDNA (Saus J., Quinones S., Otani Y., Nagase H., Harris E. D. J., Kurkinen M.: *J. Biol. Chem.* 1988 263: 6742-6745.) そして最終濃度各200 μ MのdNTPを添加した。反応primerについては、第一段階では (PROPCATfwとHR1RV), (HR1FWとHR23RV), (HR23FWとH3-5R') の3種類のprimer対をそれぞれ最終濃度1 μ Mとなるように調製した。反応条件は (94度 30秒, 50度 30秒,

72度 1.25分)×35回反応で実施した。第二段階では、第一段階で得られた反応産物を濃度測定した後、それぞれ10ngずつ新しい反応容器に入れ、今度は(CATfwとRV)というprimer対にて(94度 30秒, 55度 30秒, 72度 1分)×25回反応という条件でPCRを実施した(濃度、反応液量は第一段階と同じ)。HR23相当領域をコードする第二段階反応産物はpCRIIベクターに挿入後、配列確認を行い、制限酵素、NcoI-BamHI消化後、大腸菌発現ベクターpET3d(インヴィトロジェン社)に、ligation kit ver. 2(宝酒造)を用いて挿入した。配列確認は以下に行った。

「TA Cloning Kit (Invitrogen社製)」を使用してpCRIIベクターにPCRで増幅したフラグメントを組み込んだ。このフラグメントの挿入されたpCRIIプラスミドを、大腸菌JM109コンピテントセル(宝酒造社製)にトランスフォームした。プレート上に出現した大腸菌コロニー及びpCRIIベクターとハイブリッド形成する「5'プライマーUD(5'-ACCGAGCTCGGATCCACTAG-3')/配列番号: 20」及び「3'プライマーDU(5'-ATGCATGCTCGACGGCCGCC-3')/配列番号: 21」を用い、Taqポリメラーゼ(宝酒造社製)を用いてコロニーPCRを行った。反応産物を1%アガロースゲル電気泳動により解析し、約600~620塩基対のDNAフラグメントの増幅が認められたクローンを選択した。各クローンの大腸菌を培養し、「QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN社製)」を使用してプラスミドDNAを調製した。調製した各クローンのプラスミドDNAはプライマーUD及びプライマーDUを用い、「DNA Sequencing Kit (Perkin Elmer社製)」, 「377 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc. 製)」を用いてその核酸塩基配列解析を行った。この他の構築産物については、いずれも上述の第一段階PCR以外は同様の実施例により発現プラスミドの構築がなされた。具体的にはHR1では第一段階で(PROPCATfwとHR1RV)と(HR1FWとH3-5R')の2種類のPCRを、HR2では第一段階で(PROPCATfwとHR2RV)と(HR2FWとH3-5R')の2種類のPCRを、HR3では第一段階で(PROPCATfwとHR3RV)と(HR3FWとH3-5R')の2種類のPCRを、HR23では第一段階で(PROPCATfwとHR23RV)と(HR23FWとH3-5R')の2種類のPCRをそれぞれ実施し、反応産物を混合して第二段階PCRを行った。

【0010】実施例2

(発現方法) 各種改変MMP分子の発現は既報の方法に従った(Matsumoto S., Katoh

M., Saito S., Watanabe T., Masuho Y., Biochim. Biophys. Acta 1997, 1354:159-170)。

【0011】実施例3

(精製方法) 各種改変型MMPsは大腸菌封入体よりdenaturing(変性)とre-folding(再構成)の操作により回収された(Matsumoto S., Katoh M., Saito S., Watanabe T., Masuho Y. Biochim. Biophys. Acta 1997, 1354:159-170)。封入体より回収された改変型MMPsは以下の手順で精製を行った。封入体をre-folding後、遠心分離して得た上清は飽和硫酸溶液を終濃度20%飽和となるよう添加した後、1Mの硫酸を含む50mM Tris-HCl, 5mM CaCl₂, pH7.4で平衡化したHi-Trap Butylカラム(ファルマシア社製)に添加した。次いで硫酸濃度を1Mからリニアグラジエント法で0Mまで低下させることにより目的蛋白を溶出させた。各フラクションを電気泳動(SDS-PAGE)して、MMP-3変異体のバンドのみを含むフラクションを採取した。蛋白濃度はBSAをスタンダードとしてBradford法(BioRad社製Protein Assayキット使用)により測定した。

【0012】実施例4

(酵素活性測定法) 本発明の各種改変型MMPを含む溶液50μlと50μMの蛍光ペプチド基質(ペプチド研究所, Knight CG Willenbrock F Murphy G FEBS Lett. 1992, 296:263-266)50μlを混合し、37度で10分反応させた。その後、100mMの酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)を500μl添加し、反応を停止させ、反応溶液のうち200μlを96穴プレート(スミロン)に移した。蛍光測定は蛍光プレートリーダーFluostar (Slt Labinstrument)を使用し、λ_{ex}=320nm, λ_{em}=405nmで測定を行った。この実験より、例えば、HR2は天然型ヒトMMP-3よりも強い基質分解活性を有していた。

【0013】実施例5

(酵素安定性試験法) 41μg/mlの天然型ヒトMMP-3, HR23, ウサギMMP-3をそれぞれ600μlずつそれぞれ5本のチューブに入れ、37度で反応させ0, 1, 3, 6, 24時間の時点で反応を停止させた。各改変型MMPの安定性の測定のため、溶液の一部を密度勾配ポリアクリルアミドゲル(第一化学薬品)を用いて、電気泳動(新化学実験講座1 P329, 東京化学同人社発行)を行った。検出はsilver stain II kit wako(和光純薬)を用い

る銀染色に依った。また電気泳動と並行して、各停止時間に於ける残存酵素活性について前述の蛍光ペプチド基質を用いた方法により測定した。その結果、電気泳動による分子安定性試験では天然型ヒトMMP-3は24時間でほとんど分子が消失してしまうのに対し、ウサギMMP-3は24時間でもほとんど分解されなかった。HR23についても37度で24時間反応後、その分子は、ウサギMMP-3と同等に残存していた。このことからHR23は天然型ヒトMMP-3から4アミノ酸の変換で分子安定性が上昇したと考察される(図1)。また残存酵素活性についてもヒトMMP-3が24時間で活性が消失するのに比べ、HR23はウサギMMP-3同等に活性が残存していた(図2)。

【0014】実施例6

(angiotatin変換活性) 3 μ g/mlの天然型ヒトMMP-3, HR23, ウサギMMP-3をそれぞれ10 μ lずつそれぞれ2本のチューブに入れ、3 μ Mに調整したGlu-plasminogen (biopool社)を5 μ lずつ添加して、37度で30分、2.5時間反応させた。その後、前述の「酵素安定性試験法」と同様に溶液の一部を電気泳動を行い、銀染色法により検出を行った。その結果、何れの反応産物でも分子量38kDa近辺にangiotatin相当の断片の出現が認められた。この断片化能は天然型MMP-3に比較してHR23は効率良く、反応開始後30分ではHR23では既に初発反応基質であるplasminogenは完全に消失していた(図3)。

配列

ATG AAG AGT CTT CCA ATC CTA CTG TTG CTG TGC GTG GCA GTT TGC TCA	48
Met Lys Ser Leu Pro Ile Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala Val Cys Ser	
1 5 10 15	
GCC TAT CCA TTG GAT GGA GCT GCA AGG GGT GAG GAC ACC AGC ATG AAC	96
Ala Tyr Pro Leu Asp Gly Ala Ala Arg Gly Glu Asp Thr Ser Met Asn	
20 25 30	
CTT GTT CAG AAA TAT CTA GAA AAC TAC TAC GAC CTC AAA AAA GAT GTG	144
Leu Val Gln Lys Tyr Leu Glu Asn Tyr Tyr Asp Leu Lys Lys Asp Val	
35 40 45	
AAA CAG TTT GTT AGG AGA AAG GAC AGT GGT CCT GTT AAA AAA ATC	192
Lys Gln Phe Val Arg Arg Lys Asp Ser Gly Pro Val Val Lys Lys Ile	
50 55 60	
CGA GAA ATG CAG AAG TTC CTT GGA TTG GAG GTG ACG GGG AAG CTG GAC	240
Arg Glu Met Gln Lys Phe Leu Gly Leu Glu Val Thr Gly Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
TCC GAC ACT CTG GAG GTG ATG CGC AAG CCC AGG TGT GGA GTT CCT GAT	288
Ser Asp Thr Leu Glu Val Met Arg Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp	
85 90 95	
GTT GGT CAC TTC AGA ACC TTT CCT GGC ATC CCG AAG TGG AGG AAA ACC	336
Val Gly His Phe Arg Thr Phe Pro Gly Ile Pro Lys Trp Arg Lys Thr	
100 105 110	
CAC CTT ACA TAC AGG ATT GTG AAT TAT ACA CCA GAT TTG CCA AAA GAT	384

【0015】

【発明の効果】本発明改変型ヒトMMP-3又はその断片は、天然のヒトMMP-3と比較し、短時間では分解されないという優れた安定性を有する。また本発明は椎間板ヘルニア治療の一種であるchemonucleolysis療法で使用されてきたキモバインに比べ抗原性及びアナフィラキシーショックの問題を解決できる利点を有する。更に今回改変型ヒトMMP-3は、プラスミノゲン(plasminogen)を消化することにより血管内皮細胞増殖抑制因子であるアンジオスタチン(angiotatin)を得るという変換活性を有するため、この機序に基づく抗腫瘍剤としても有用である。また、本発明改変型ヒトMMP-3又はその断片は、大腸菌を用いた遺伝子工学的手法で製造されることから、工業的生産において有用である。更に得られた本発明改変型ヒトMMP-3又はその断片がアンジオスタチン変換活性を有するため、アンジオスタチンを大量に安価に取得するためのツールとしても利用可能である。

【0016】

【配列表】

配列番号: 1
配列の長さ: 1434
配列の型: 核酸
鎖の数: 二本鎖
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: cDNA to mRNA

15

16

His Leu Thr Tyr Arg Ile Val Asn Tyr Thr Pro Asp Leu Pro Lys Asp	
115 120 125	
GCT GTT GAT TCT GCT GTT GAG AAA GCT CTG AAA GTC TGG GAA GAG GTG	432
Ala Val Asp Ser Ala Val Glu Lys Ala Leu Lys Val Trp Glu Glu Val	
130 135 140	
ACT CCA CTC ACA TTC TCC AGG CTG TAT GAA GGA GAG GCT GAT ATA ATG	480
Thr Pro Leu Thr Phe Ser Arg Leu Tyr Glu Gly Glu Ala Asp Ile Met	
145 150 155 160	
ATC TCT TTT GCA GTT AGA GAA CAT GGA GAC TTT TAC CCT TTT GAT GGA	528
Ile Ser Phe Ala Val Arg Glu His Gly Asp Phe Tyr Pro Phe Asp Gly	
165 170 175	
CCT GGA AAT GTT TTG GCC CAT GCC TAT GCC CCT GGG CCA GGG ATT AAT	576
Pro Gly Asn Val Leu Ala His Ala Tyr Ala Pro Gly Pro Gly Ile Asn	
180 185 190	
GGA GAT GCC CAC TTT GAT GAT GAT GAA CAA TGG ACA AAG GAT ACA ACA	624
Gly Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu Gln Trp Thr Lys Asp Thr Thr	
195 200 205	
GGG ACC AAT TTA TTT CTC GTT GCT GCT CAT GAA ATT GGC CAC TCC CTG	672
Gly Thr Asn Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Ile Gly His Ser Leu	
210 215 220	
GGT CTC TTT CAC TCA GCC AAC ACT GAA GCT TTG ATG TAC CCA CTC TAT	720
Gly Leu Phe His Ser Ala Asn Thr Glu Ala Leu Met Tyr Pro Leu Tyr	
225 230 235 240	
CAC TCA CTC ACA GAC CTG ACT CGG TTC CGC CTG TCT CAA GAT GAT ATA	768
His Ser Leu Thr Asp Leu Thr Arg Phe Arg Leu Ser Gln Asp Asp Ile	
245 250 255	
AAT GGC ATT CAG TCC CTC TAT GGA CCT CCC CCT GAC TCC CCT GAG ACC	816
Asn Gly Ile Gln Ser Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Asp Ser Pro Glu Thr	
260 265 270	
CCC CTG GTA CCC ACG GAA CCT GTC CCT CCA GAA CCT GGG ACG CCA GCC	864
Pro Leu Val Pro Thr Glu Pro Val Pro Pro Glu Pro Gly Thr Pro Ala	
275 280 285	
AAC TGT GAT CCT GCT TTG TCC TTT GAT GCT GTC AGC ACT CTG AGG GGA	912
Asn Cys Asp Pro Ala Leu Ser Phe Asp Ala Val Ser Thr Leu Arg Gly	
290 295 300	
GAA ATC CTG ATC TTT AAA GAC AGG CAC TTT TGG CGC AAA TCC CTC AGG	960
Glu Ile Leu Ile Phe Lys Asp Arg His Phe Trp Arg Lys Ser Leu Arg	
305 310 315 320	
AAG CTT GAA CCT GAA TTG CAT TTG ATC TCT TCA TTT TGG CCA TCT CTT	1008
Lys Leu Glu Pro Glu Leu His Leu Ile Ser Ser Phe Trp Pro Ser Leu	
325 330 335	
CCT TCA GGC GTG GAT GCC GCA TAT GAA GTT ACT AGC AAG GAC CTC GTT	1056
Pro Ser Gly Val Asp Ala Ala Tyr Glu Val Thr Ser Lys Asp Leu Val	
340 345 350	
TTC ATT TTT AAA GGA AAT CAA TTC TGG GCC ATC AGA GGA AAT GAG GTA	1104
Phe Ile Phe Lys Gly Asn Gln Phe Trp Ala Ile Arg Gly Asn Glu Val	
355 360 365	
CGA GCT GGA TAC CCA AGA GGC ATC CAC ACC CTA GGT TTC CCT CCA ACC	1152
Arg Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Ile His Thr Leu Gly Phe Pro Pro Thr	
370 375 380	

17

18

GTG AGG AAA ATC GAT GCA GCC ATT TCT GAT AAG GAA AAG AAC AAA ACA 1200
 Val Arg Lys Ile Asp Ala Ala Ile Ser Asp Lys Glu Lys Asn Lys Thr
 385 390 395 400
 TAT TTC TTT GTA GAG GAC AAA TAC TGG AGA TTT GAT GAG AAG AGA AAT 1248
 Tyr Phe Phe Val Glu Asp Lys Tyr Trp Arg Phe Asp Glu Lys Arg Asn
 405 410 415
 TCC ATG GAG CCA GGC TTT CCC AAG CAA ATA GCT GAA GAC TTT CCA GGG 1296
 Ser Met Glu Pro Gly Phe Pro Lys Gln Ile Ala Glu Asp Phe Pro Gly
 420 425 430
 ATT GAC TCA AAG ATT GAT GCT GTT TTT GAA GAA TTT GGG TTC TTT TAT 1344
 Ile Asp Ser Lys Ile Asp Ala Val Phe Glu Glu Phe Gly Phe Phe Tyr
 435 440 445
 TTC TTT ACT GGA TCT TCA CAG TTG GAG TTT GAC CCA AAT GCA AAG AAA 1392
 Phe Phe Thr Gly Ser Ser Gln Leu Glu Phe Asp Pro Asn Ala Lys Lys
 450 455 460
 GTG ACA CAC ACT TTG AAG AGT AAC AGC TGG CTT AAT TGT TGA 1434
 al Thr His Thr Leu Lys Ser Asn Ser Trp Leu Asn Cys
 465 470 475

配列番号 : 2

配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 477

20 トポロジー : 直鎖状

配 列

Met Lys Ser Leu Pro Ile Leu Leu Leu Cys Val Ala Val Cys Ser
 1 5 10 15
 Ala Tyr Pro Leu Asp Gly Ala Ala Arg Gly Glu Asp Thr Ser Met Asn
 20 25 30
 Leu Val Gln Lys Tyr Leu Glu Asn Tyr Tyr Asp Leu Lys Lys Asp Val
 35 40 45
 Lys Gln Phe Val Arg Arg Lys Asp Ser Gly Pro Val Val Lys Lys Ile
 50 55 60
 Arg Glu Met Gln Lys Phe Leu Gly Leu Glu Val Thr Gly Lys Leu Asp
 65 70 75 80
 Ser Asp Thr Leu Glu Val Met Arg Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp
 85 90 95
 Val Gly His Phe Arg Thr Phe Pro Gly Ile Pro Lys Trp Arg Lys Thr
 100 105 110
 His Leu Thr Tyr Arg Ile Val Asn Tyr Thr Pro Asp Leu Pro Lys Asp
 115 120 125
 Ala Val Asp Ser Ala Val Glu Lys Ala Leu Lys Val Trp Glu Glu Val
 130 135 140
 Thr Pro Leu Thr Phe Ser Arg Leu Tyr Glu Gly Glu Ala Asp Ile Met
 145 150 155 160
 Ile Ser Phe Ala Val Arg Glu His Gly Asp Phe Xaa Pro Phe Asp Gly
 165 170 175
 Pro Gly Asn Val Leu Ala His Ala Tyr Ala Pro Gly Pro Gly Ile Asn
 180 185 190
 Gly Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu Gln Trp Thr Lys Asp Thr Thr
 195 200 205
 Gly Thr Asn Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Ile Gly His Ser Leu
 210 215 220
 Gly Leu Phe His Ser Ala Asn Thr Glu Ala Leu Met Tyr Pro Xaa Tyr

19

20

225 230 235 240
 Xaa Xaa Xaa Thr Asp Leu Thr Arg Phe Arg Leu Ser Gln Asp Asp Ile
 245 250 255
 Asn Gly Ile Gln Ser Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Asp Ser Pro Glu Thr
 260 265 270
 Pro Leu Val Pro Thr Glu Pro Val Pro Pro Glu Pro Gly Thr Pro Ala
 275 280 285
 Asn Cys Asp Pro Ala Leu Ser Phe Asp Ala Val Ser Thr Leu Arg Gly
 290 295 300
 Glu Ile Leu Ile Phe Lys Asp Arg His Phe Trp Arg Lys Ser Leu Arg
 305 310 315 320
 Lys Leu Glu Pro Glu Leu His Leu Ile Ser Ser Phe Trp Pro Ser Leu
 325 330 335
 Pro Ser Gly Val Asp Ala Ala Tyr Glu Val Thr Ser Lys Asp Leu Val
 340 345 350
 Phe Ile Phe Lys Gly Asn Gln Phe Trp Ala Ile Arg Gly Asn Glu Val
 355 360 365
 Arg Ala Gly Tyr Pro Arg Gly Ile His Thr Leu Gly Phe Pro Pro Thr
 370 375 380
 Val Arg Lys Ile Asp Ala Ala Ile Ser Asp Lys Glu Lys Asn Lys Thr
 385 390 395 400
 Tyr Phe Phe Val Glu Asp Lys Tyr Trp Arg Phe Asp Glu Lys Arg Asn
 405 410 415
 Ser Met Glu Pro Gly Phe Pro Lys Gln Ile Ala Glu Asp Phe Pro Gly
 420 425 430
 Ile Asp Ser Lys Ile Asp Ala Val Phe Glu Glu Phe Gly Phe Phe Tyr
 435 440 445
 Phe Phe Thr Gly Ser Ser Gln Leu Glu Phe Asp Pro Asn Ala Lys Lys
 450 455 460
 Val Thr His Thr Leu Lys Ser Asn Ser Trp Leu Asn Cys
 465 470 475

配列番号 : 3

配列の長さ : 5 3 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配 列

ATGGCTAGC TTC AGA ACC TTT CCT GGC ATC CCG AAG TGG AGG AAA ACC CAC 51
 Phe Arg Thr Phe Pro Gly Ile Pro Lys Trp Arg Lys Thr His
 1 5 10
 CTT ACA TAC AGG ATT GTG AAT TAT ACA CCA GAT TTG CCA AAA GAT GCT 99
 Leu Thr Tyr Arg Ile Val Asn Tyr Thr Pro Asp Leu Pro Lys Asp Ala
 15 20 25 30
 GTT GAT TCT GCT GTT GAG AAA GCT CTG AAA GTC TGG GAA GAG GTG ACT 147
 Val Asp Ser Ala Val Glu Lys Ala Leu Lys Val Trp Glu Glu Val Thr
 35 40 45
 CCA CTC ACA TTC TCC AGG CTG TAT GAA GGA GAG GCT GAT ATA ATG ATC 195
 Pro Leu Thr Phe Ser Arg Leu Tyr Glu Gly Glu Ala Asp Ile Met Ile
 50 55 60
 TCT TTT GCA GTT AGA GAA CAT GGA GAC TTT ATT CCT TTT GAT GGA CCT 243
 Ser Phe Ala Val Arg Glu His Gly Asp Phe Ile Pro Phe Asp Gly Pro
 65 70 75

21		22
GGA AAT GTT TTG GCC CAT GCC TAT GCC CCT GGG CCA GGG ATT AAT GGA	291	
Gly Asn Val Leu Ala His Ala Tyr Ala Pro Gly Pro Gly Ile Asn Gly		
80 85 90		
GAT GCC CAC TTT GAT GAT GAT GAA CAA TGG ACA AAG GAT ACA ACA GGG	339	
Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu Gln Trp Thr Lys Asp Thr Thr Gly		
95 100 105 110		
ACC AAT TTA TTT CTC GTT GCT GCT CAT GAA ATT GGC CAC TCC CTG GGT	387	
Thr Asn Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Ile Gly His Ser Leu Gly		
115 120 125		
CTC TTT CAC TCA GCC AAC ACT GAA GCT TTG ATG TAC CCA GTC TAT AAC	435	
Leu Phe His Ser Ala Asn Thr Glu Ala Leu Met Tyr Pro Val Tyr Asn		
130 135 140		
GCC TTC ACA GAC CTG ACT CGG TTC CGC CTG TCT CAA GAT GAT ATA AAT	483	
Ala Phe Thr Asp Leu Thr Arg Phe Arg Leu Ser Gln Asp Asp Ile Asn		
145 150 155		
GGC ATT CAG TCC CTC TAT GGA CCT CCC CCT GAC TCC CCT GAG ACC CCC	531	
Gly Ile Gln Ser Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Asp Ser Pro Glu Thr Pro		
160 165 170		
CTG TGA	537	
Leu		
175		

配列番号 : 4

配列の長さ : 537

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配 列

ATGGCTAGC TTC AGA ACC TTT CCT GGC ATC CCG AAG TGG AGG AAA ACC CAC	51	
Phe Arg Thr Phe Pro Gly Ile Pro Lys Trp Arg Lys Thr His		
1 5 10		
CTT ACA TAC AGG ATT GTG AAT TAT ACA CCA GAT TTG CCA AAA GAT GCT	99	
Leu Thr Tyr Arg Ile Val Asn Tyr Thr Pro Asp Leu Pro Lys Asp Ala		
15 20 25 30		
GTT GAT TCT GCT GTT GAG AAA GCT CTG AAA GTC TGG GAA GAG CTG ACT	147	
Val Asp Ser Ala Val Glu Lys Ala Leu Lys Val Trp Glu Glu Val Thr		
35 40 45		
CCA CTC ACA TTC TCC AGG CTG TAT GAA GGA GAG GCT GAT ATA ATG ATC	195	
Pro Leu Thr Phe Ser Arg Leu Tyr Glu Gly Glu Ala Asp Ile Met Ile		
50 55 60		
TCT TTT GCA GTT AGA GAA CAT GGA GAC TTT TAT CCT TTT GAT GGA CCT	243	
Ser Phe Ala Val Arg Glu His Gly Asp Phe Tyr Pro Phe Asp Gly Pro		
65 70 75		
GGA AAT GTT TTG GCC CAT GCC TAT GCC CCT GGG CCA GGG ATT AAT GGA	291	
Gly Asn Val Leu Ala His Ala Tyr Ala Pro Gly Pro Gly Ile Asn Gly		
80 85 90		
GAT GCC CAC TTT GAT GAT GAT GAA CAA TGG ACA AAG GAT ACA ACA GGG	339	
Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu Gln Trp Thr Lys Asp Thr Thr Gly		
95 100 105 110		
ACC AAT TTA TTT CTC GTT GCT GCT CAT GAA ATT GGC CAC TCC CTG GGT	387	
Thr Asn Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Ile Gly His Ser Leu Gly		
115 120 125		
CTC TTT CAC TCA GCC AAC ACT GAA GCT TTG ATG TAC CCA GTC TAT CAC	435	

23

24

Leu Phe His Ser Ala Asn Thr Glu Ala Leu Met Tyr Pro Val Tyr His
 130 135 140
 TCA CTC ACA GAC CTG ACT CGG TTC CGC CTG TCT CAA GAT GAT ATA AAT 483
 Ser Leu Thr Asp Leu Thr Arg Phe Arg Leu Ser Gln Asp Asp Ile Asn
 145 150 155
 GGC ATT CAG TCC CTC TAT GGA CCT CCC CCT GAC TCC CCT GAG ACC CCC 531
 Gly Ile Gln Ser Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Asp Ser Pro Glu Thr Pro
 160 165 170
 CTG TGA 537
 Leu
 175

配列番号 : 5

配列の長さ : 5 3 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配 列

ATGGCTAGC TTC AGA ACC TTT CCT GGC ATC CCG AAG TGG AGG AAA ACC CAC 51
 Phe Arg Thr Phe Pro Gly Ile Pro Lys Trp Arg Lys Thr His
 1 5 10
 CTT ACA TAC AGG ATT GTG AAT TAT ACA CCA GAT TTG CCA AAA GAT GCT 99
 Leu Thr Tyr Arg Ile Val Asn Tyr Thr Pro Asp Leu Pro Lys Asp Ala
 15 20 25 30
 GTT GAT TCT GCT GTT GAG AAA GCT CTG AAA GTC TGG GAA GAG GTG ACT 147
 Val Asp Ser Ala Val Glu Lys Ala Leu Lys Val Trp Glu Glu Val Thr
 35 40 45
 CCA CTC ACA TTC TCC AGG CTG TAT GAA GGA GAG GCT GAT ATA ATG ATC 195
 Pro Leu Thr Phe Ser Arg Leu Tyr Glu Gly Glu Ala Asp Ile Met Ile
 50 55 60
 TCT TTT GCA GTT AGA GAA CAT GGA GAC TTT TAT CCT TTT GAT GGA CCT 243
 Ser Phe Ala Val Arg Glu His Gly Asp Phe Tyr Pro Phe Asp Gly Pro
 65 70 75
 GGA AAT GTT TTG GCC CAT GCC TAT GCC CCT GGG CCA GGG ATT AAT GGA 291
 Gly Asn Val Leu Ala His Ala Tyr Ala Pro Gly Pro Gly Ile Asn Gly
 80 85 90
 GAT GCC CAC TTT GAT GAT GAT GAA CAA TGG ACA AAG GAT ACA ACA GGG 339
 Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu Gln Trp Thr Lys Asp Thr Thr Gly
 95 100 105 110
 ACC AAT TTA TTT CTC GTT GCT GCT CAT GAA ATT GGC CAC TCC CTG GGT 387
 Thr Asn Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Ile Gly His Ser Leu Gly
 115 120 125
 CTC TTT CAC TCA GCC AAC ACT GAA GCT TTG ATG TAC CCA GTC TAT AAC 435
 Leu Phe His Ser Ala Asn Thr Glu Ala Leu Met Tyr Pro Val Tyr Asn
 130 135 140
 GCC TTC ACA GAC CTG ACT CGG TTC CGC CTG TCT CAA GAT GAT ATA AAT 483
 Ala Phe Thr Asp Leu Thr Arg Phe Arg Leu Ser Gln Asp Asp Ile Asn
 145 150 155
 GGC ATT CAG TCC CTC TAT GGA CCT CCC CCT GAC TCC CCT GAG ACC CCC 531
 Gly Ile Gln Ser Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Asp Ser Pro Glu Thr Pro
 160 165 170
 CTG TGA 537

25

26

Leu
175

配列番号 : 6

配列の長さ : 5 3 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配 列

```

ATGGCTAGC TTC AGA ACC TTT CCT GGC ATC CCG AAG TGG AGG AAA ACC CAC      51
      Phe Arg Thr Phe Pro Gly Ile Pro Lys Trp Arg Lys Thr His
          1             5             10
CTT ACA TAC AGG ATT GTG AAT TAT ACA CCA GAT TTG CCA AAA GAT GCT      99
Leu Thr Tyr Arg Ile Val Asn Tyr Thr Pro Asp Leu Pro Lys Asp Ala
15             20             25             30
GIT GAT TCT GCT GTT GAG AAA GCT CTG AAA GTC TGG GAA GAG GTG ACT      147
Val Asp Ser Ala Val Glu Lys Ala Leu Lys Val Trp Glu Glu Val Thr
          35             40             45
CCA CTC ACA TTC TCC AGG CTG TAT GAA GGA GAG GCT GAT ATA ATG ATC      195
Pro Leu Thr Phe Ser Arg Leu Tyr Glu Gly Glu Ala Asp Ile Met Ile
          50             55             60
TCT TTT GCA GTT AGA GAA CAT GGA GAC TTT TAT CCT TTT GAT GGA CCT      243
Ser Phe Ala Val Arg Glu His Gly Asp Phe Tyr Pro Phe Asp Gly Pro
          65             70             75
GGA AAT GTT TTG GCC CAT GCC TAT GCC CCT GGG CCA GGG ATT AAT GGA      291
Gly Asn Val Leu Ala His Ala Tyr Ala Pro Gly Pro Gly Ile Asn Gly
          80             85             90
GAT GCC CAC TTT GAT GAT GAT GAA CAA TGG ACA AAG GAT ACA ACA GGG      339
Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu Gln Trp Thr Lys Asp Thr Thr Gly
          95             100             105             110
ACC AAT TTA TTT CTC GTT GCT GCT CAT GAA ATT GGC CAC TCC CTG GGT      387
Thr Asn Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Ile Gly His Ser Leu Gly
          115             120             125
CTC TTT CAC TCA GCC AAC ACT GAA GCT TTG ATG TAC CCA CTC TAT AAC      435
Leu Phe His Ser Ala Asn Thr Glu Ala Leu Met Tyr Pro Leu Tyr Asn
          130             135             140
GCC TTC ACA GAC CTG ACT CGG TTC CGC CTG TCT CAA GAT GAT ATA AAT      483
Ala Phe Thr Asp Leu Thr Arg Phe Arg Leu Ser Gln Asp Asp Ile Asn
          145             150             155
GGC ATT CAG TCC CTC TAT GGA CCT CCC CCT GAC TCC CCT GAG ACC CCC      531
Gly Ile Gln Ser Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Asp Ser Pro Glu Thr Pro
          160             165             170
CTG TGA      537
Leu
175

```

配列番号 : 7

配列の長さ : 1 7 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配 列

```

Phe Arg Thr Phe Pro Gly Ile Pro Lys Trp Arg Lys Thr His Leu Thr
1             5             10             15
Tyr Arg Ile Val Asn Tyr Thr Pro Asp Leu Pro Lys Asp Ala Val Asp

```

27

28

20 25 30
 Ser Ala Val Glu Lys Ala Leu Lys Val Trp Glu Glu Val Thr Pro Leu
 35 40 45
 Thr Phe Ser Arg Leu Tyr Glu Gly Glu Ala Asp Ile Met Ile Ser Phe
 50 55 60
 Ala Val Arg Glu His Gly Asp Phe Xaa Pro Phe Asp Gly Pro Gly Asn
 65 70 75 80
 Val Leu Ala His Ala Tyr Ala Pro Gly Pro Gly Ile Asn Gly Asp Ala
 85 90 95
 His Phe Asp Asp Asp Glu Gln Trp Thr Lys Asp Thr Thr Gly Thr Asn
 100 105 110
 Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Ile Gly His Ser Leu Gly Leu Phe
 115 120 125
 His Ser Ala Asn Thr Glu Ala Leu Met Tyr Pro Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa
 130 135 140
 Thr Asp Leu Thr Arg Phe Arg Leu Ser Gln Asp Asp Ile Asn Gly Ile
 145 150 155 160
 Gln Ser Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Asp Ser Pro Glu Thr Pro Leu
 165 170 175

配列番号：8

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACATGGAGAC TTTATTCCTT TTGATGGACC TGGAA

配列番号：9

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTCCAGGTCC ATCAAAAGGA ATAAAGTCTC CATGT

配列番号：10

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGTACCCAG TCTATCACTC ACTCACAGAC CTGAC

配列番号：11

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCAGGTCTG TGAGTGAGTG ATA
 GACTGGG TACAT

配列番号：12

配列の長さ：35

20 配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGTACCCAC TCTATAACGC CTT
 CACAGAC CTGAC

配列番号：13

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCAGGTCTG TGAAGCCGTT ATAGAGTGGG TACAT

配列番号：14

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGTACCCAG TCTATAACGC CTTCACAGAC CTGAC

40 配列番号：15

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCAGGTCTG TGAAGCCGTT ATAGACTGGG TACAT

配列番号：16

配列の長さ：29

配列の型：核酸

50 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CATGCCATGG CCTATCCATT GGATGGAGC

配列番号：17

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CATGCCATGG CTAGCTTCAG AACCTTTCCT GGCAT

配列番号：18

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCATCCACGC CTGAAGGAAG

配列番号：19

配列の長さ：32

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

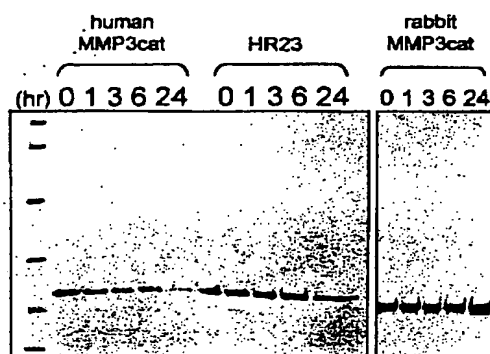
配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGCGGATCCT CACAGGGGGG TCTCAGGGGA GT

配列番号：20

【図1】



配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACCGAGCTCG GATCCACTAG

配列番号：21

配列の長さ：21

配列の型：核酸

10 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGCATGCTC GAGCGGCCGC C

【0017】

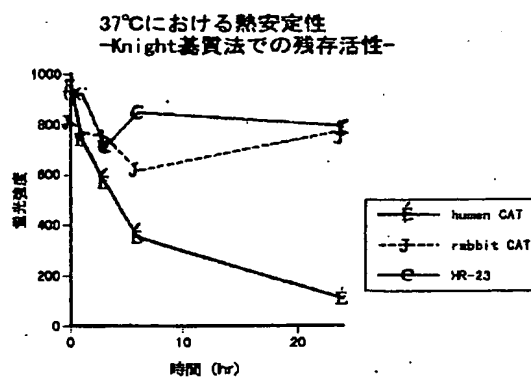
【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒト、ウサギ、HR23をそれぞれ37℃でインキュベーションした後、SDS-PAGEにより、分子存在形態を調べた図である。

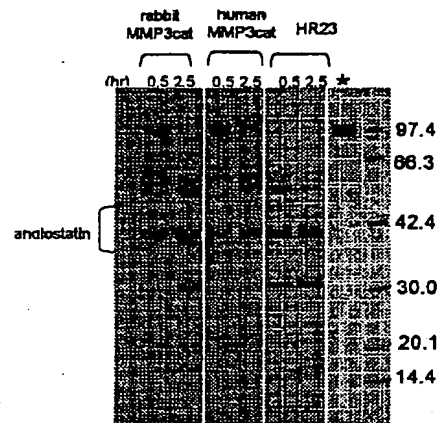
【図2】 ヒト、ウサギ、HR23をそれぞれ37℃でインキュベーションした後、酵素活性をペプチド基質を用いて測定したグラフ。

20 【図3】 plasminogen及びアンジオスタチンの各種MMP-3存在下での分子存在形態を調べた図。

【図2】



【図3】



★ plasminogen 単独で反応させたもの

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 9/64

A 6 1 K 37/48 - A E D

// (C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/64

C 1 2 R 1:19)

(72) 発明者 酒薬 奈々

東京都墨田区1-23-1 アサヒビル吾
妻橋ビル 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 斉藤 茂樹

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株
式会社内

(72) 発明者 ▲高▼山 真理

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株
式会社内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.